

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01145165.3

C12N 15/33

C12N 15/87

C12N 15/90

A61K 39/12

A01H 1/00

A61P 31/12

[45] 授权公告日 2005 年 7 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 1212399C

[22] 申请日 2001.12.31 [21] 申请号 01145165.3  
[71] 专利权人 甘肃亚盛集团  
地址 730030 甘肃省兰州市张掖路 219 号基  
隆大厦 21 层  
共同专利权人 中国科学院遗传研究所  
[72] 发明人 周长生 胡赞民 杜若甫 陈正华  
石 锐  
审查员 孙俊荣

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限公司  
代理人 李 悦

权利要求书 1 页 说明书 27 页 附图 1 页

[54] 发明名称 用于生产口蹄疫疫苗的山苣荬叶绿体转化植物的获得方法

[57] 摘要

本发明涉及一种生产口蹄疫多肽疫苗的山苣荬叶绿体转基因植物获得的方法。该方法包括：口蹄疫多肽疫苗基因序列及其合成方法，如合成的 SEQ ID NO：1 及 SEQ ID NO：2 所示序列，将该序列与绿色荧光蛋白基因串联，得到融合的疫苗基因。该融合疫苗基因连接于苣荬叶绿体 psbA 基因启动子下游从而构建为叶绿体表达框。同时将该疫苗基因构建到 SEQ ID NO：3 和 SEQ ID NO：4 所示序列之间，构建成山苣荬叶绿体定点转化载体。用该转化载体转化山苣荬，并获得表达口蹄疫多肽疫苗的山苣荬叶绿体转基因植物。

1. 一种生产 O 型口蹄疫多肽疫苗的山莴苣叶绿体转基因植物的获  
5 得方法, 包括以下步骤:

(1) 合成 O 型口蹄疫多肽疫苗基因序列, 使之与报告基因或具有强免疫源性蛋白的基因串联得到融合的疫苗基因, 该融合的疫苗基因连接于莴苣叶绿体 psbA 基因启动子下游从而构建为叶绿体表达框;

(2) 构建用于向山莴苣叶绿体中定点转化外源基因的莴苣叶绿体相关  
10 DNA 序列;

(3) 将步骤(2)构建出来的 DNA 序列与步骤(1)合成的融合的 O 型口蹄疫多肽疫苗基因重组, 使融合的疫苗基因序列位于莴苣叶绿体相关 DNA 序列的中间;

(4) 将步骤(3)中重组得到的 DNA 片段插入到克隆载体的多克隆位点  
15 上, 作为 O 型口蹄疫多肽疫苗基因山莴苣叶绿体定点转化载体; 和

(5) 用得到的转化载体转化山莴苣植物细胞, 获得叶绿体表达多肽疫苗的转基因植物。

2. 按照权利要求 1 的方法, 其中步骤(1)中所述的编码 O 型口蹄疫多肽疫苗的基因具有 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 所示序列。

3. 按照权利要求 1 的方法, 其中步骤(2)中所述的用于向山莴苣叶绿体中定点转化外源基因的 DNA 序列具有 SEQ ID NO:3 所示序列或其不小于 1kb 的片段和 SEQ ID NO:4 所示序列或其不小于 1kb 的片段。  
20

4. 按照权利要求 3 的方法, 其中步骤(3)中所述融合的疫苗基因位于 SEQ ID NO:3 和 SEQ IN NO:4 的中间。

5. 按照权利要求 1 的方法, 其中步骤(1)所述的报告基因是绿色荧光蛋白基因, 所述具有强免疫源性蛋白的基因选自 O 型口蹄疫病毒 VP1 蛋白基因或乙肝核心蛋白基因。  
25

## 用于生产口蹄疫疫苗的山莴苣叶绿体 转化植物的获得方法

### 发明领域

本发明涉及一种生产口蹄疫多肽疫苗的山莴苣叶绿体转基因植物的获得方法。具体的说，该方法包括：合成口蹄疫多肽疫苗基因序列；将该序列与报告基因或具有强免疫源性蛋白的基因串联，使之成为融合疫苗基因；构建用于定点转化的莴苣叶绿体相关 DNA 序列；用此序列构建含口蹄疫多肽疫苗基因的山莴苣叶绿体定点转化载体；用该转化载体转化山莴苣，获得表达口蹄疫多肽疫苗的山莴苣叶绿体转基因植物。

### 背景技术

口蹄疫是由口蹄疫病毒引起偶蹄动物的一种急性、烈性传染病，以直接接触方式传染，危害对象是猪、牛、羊等家畜和几十种其它偶蹄类动物，其传染速度极快且易引发大流行，对畜牧业的危害极大，已被国际动物卫生法典列为 18 种 A 类疫病之首。由于口蹄疫一旦发生将直接影响一个国家或地区的畜产品的出口贸易和国际声誉，为此一些国家甚至采取将病畜销毁等强制性措施来阻止和防止疫情的扩大。预防口蹄疫是仍是防治口蹄疫的最有效方法，常用方法是注射口蹄疫疫苗。但口蹄疫有较多的血清免疫类型，且各型间的疫苗不能提供交叉保护，所以在预防口蹄疫发生时，多用与当地流行的病毒型相同的口蹄疫疫苗。如何能提供足够数量有效的疫苗，并能有效地进行免疫，是预防口蹄疫的关键。

常用的口蹄疫疫苗是利用 BHK（鼠肾细胞系）传代细胞系方法来生产灭活疫苗，这类疫苗免疫效果好，但生产涉及动物细胞培养技术，不但生产投入大、成本高，且动物细胞培养易污染，所以只能在少数设备完备的实验室或生物产品工厂才有能力生产，另外在这种疫苗生产中要大量繁殖病毒，而该病毒又能通过空气传播，所以一旦失控将造成严重

后果。为此需要大力开发安全性好的其它类型疫苗。现在研究较多的是合成肽疫苗、基因工程疫苗等。

合成肽是人工合成的具有保护作用的类似于天然抗原决定的肽，由这种肽制成的疫苗安全性好，然而合成的费用仍较高；基因工程疫苗  
5 则以病毒颗粒中的具有免疫源性亚单位蛋白或多肽的 DNA 序列作为目的基因，通过原核表达系统表达疫苗组份。由于这种方法生产疫苗不涉及病毒本身，所以的安全性好，不过它同合成肽疫苗一样仍有成本高的缺点，其原因是亚单位蛋白或多肽的免疫源性比普通灭活苗低，故需要大量注射从而增加了应用成本。

10 为降低基因工程疫苗的使用成本，利用植物作为生物反应器表达和生产疫苗是一个较好的选择，这方法的生产条件要求远比动物细胞培养低，只要有土地就能大规模生产；由于植物的内热源物质少，所以从植物中提取疫苗的纯化成本也很低。值得注意的是第一个利用转基因植物表达的病毒疫苗并使免疫动物全部获得保护的，正是口蹄疫方面的工作。  
15 另外，目前正在探索食用疫苗的应用，若这一设想能在口蹄疫疫苗上得以实现不但可能进一步降低疫苗成本，也利于运输和应用，对边远地区的口蹄疫防治工作极为有利。

现有最常用的植物核表达体系表达水平低，如用核基因转化获得转疫苗基因的植物中最高疫苗蛋白量仅为总蛋白的 0.37%，近期发展起来  
20 的高等植物叶绿体转化则为这一工作提供了新的途径，利用植物的叶绿体转化可克服向核基因组中转化的很多不足并具有独特的优越性。如：

（1）高效表达：由于叶绿体基因组的拷贝数非常大（例如每个成熟叶肉细胞中可达 10000 个拷贝），整合在其中的外源基因也有可能以高拷贝数存在，这就必然为外源基因的高效表达提供了条件；（2）原核基因无  
25 需修饰改造；（3）安全性好：叶绿体多为母系遗传，从而保证了基因工程的安全性，特别是避免了外源基因向杂草或其他非目的植物的传播。

（4）叶绿体基因组小，便于遗传操作，可以实现定点整合，消除了核转化中存在的“位置效应”，并减少对植物的生长发育影响。

由于叶绿体可超量表达外源蛋白，因此，植物的叶绿体有可能成为工  
30 业用酶或药用蛋白的“生物反应器”，现有工作表明通过叶绿体表达外

源基因，其表达量通常是核表达的 100 以上，目前工作中最高表达量已达总可溶蛋白的 46%，这充分表明利用叶绿体转化技术生产蛋白质药物或疫苗的可行性。本发明所涉及工作即是利用一种饲料植物—山莴苣的叶绿体定点转化和表达技术获得表达口蹄疫疫苗的饲料植物。

5

## 发明描述

本发明涉及一种用于生产口蹄疫多肽疫苗的饲料植物山莴苣叶绿体转基因植物的方法，该方法包括以下步骤：

(1) 合成口蹄疫多肽疫苗基因序列，使之与报告基因或具有强免疫源性蛋白的基因串联得到融合的疫苗基因，该融合的疫苗基因连接于莴苣叶绿体 *psbA* 基因启动子下游从而构建为叶绿体表达框；

(2) 构建用于向山莴苣叶绿体中定点转化外源基因的莴苣叶绿体相关 DNA 序列；

(3) 将步骤(2)构建出来的 DNA 序列与步骤(1)合成的融合的 口蹄疫多肽疫苗基因重组，使融合的疫苗基因序列位于莴苣叶绿体相关 DNA 序列的中间；

(4) 将步骤(3)中重组得到的 DNA 片段插入到克隆载体的多克隆位点上，作为口蹄疫多肽疫苗基因山莴苣叶绿体定点转化载体；和

(5) 用得到的转化载体转化山莴苣植物细胞，获得叶绿体表达多肽疫苗的转基因植物。

本发明还涉及一种向山莴苣叶绿体定点转化外源 DNA 的方法，该方法包括以下步骤：

(1) 构建用于向山莴苣叶绿体定点转化外源基因的莴苣叶绿体相关 DNA 片段；

(2) 将步骤(1)构建出的 DNA 片段与外源基因重组，使外源基因序列位于莴苣叶绿体相关 DNA 序列的中间；

(3) 将步骤(2)重组得到的 DNA 片段插入到克隆载体的多克隆位点上，作为外源基因山莴苣叶绿体定点转化载体；和

(4) 用步骤(3)得到的转化载体转化山莴苣，使外源基因在山莴苣叶绿体中表达。

具体地讲, 本发明所述的编码口蹄疫多肽疫苗基因含有 SEQ ID NO:1 及 SEQ ID NO:2 所示序列, 其获得是将口蹄疫病毒蛋白中有免疫源性部分的序列从新设计, 使其适合于原核表达, 然后进行人工合成。发明中所提供的口蹄疫免疫源性的氨基酸序列, 来自国内 O 型 58 和 86 株系病毒口蹄疫 VP1 蛋白上第 140-160 和 200-213 氨基酸序列, 这两段序列是公认具有免疫源性的病毒组份, 是经过比较优选出来的。同时, 其 DNA 序列是参考大肠杆菌偏爱的密码子重新设计并合成的。大肠杆菌密码子使用偏爱情况的数据可以从因特网相关网站上获得。

本发明中还提供了一种口蹄疫多肽序列的拼接方式, 即发明中 DNA 片段上编码多肽序列的拼接有两种方式, 一为 O58 株系的第 140-160 氨基酸接上 O58 株系第 200-213 氨基酸, 再串联上 O86 株系的第 140-160 氨基酸和第 200-213 氨基酸的肽链; 另一为 O86 株系的第 140-160 氨基酸接上第 200-213 氨基酸, 再串联上 O58 株系的第 140-160 氨基酸接和第 200-213 氨基酸的肽链。

由于上述所述的多肽 DNA 序列编码蛋白分子量小, 不利于积累, 所以本发明中还将上述多肽的 DNA 序列再与其它分子量较大的蛋白串联, 本发明中采用与绿色荧光蛋白基因的 DNA 序列串联, 从而构建为具免疫源性的多肽-绿色荧光蛋白的融合蛋白形式的疫苗基因。虽然如此, 本发明中与口蹄疫疫苗基因串联的基因也不限于绿色荧光蛋白基因, 还可以使用其它形式串联的基因, 如口蹄疫病毒 VP1 蛋白基因序列或其它有同样功能的多肽片段, 特别是一些有强免疫源性的蛋白基因, 如乙型肝炎核心蛋白基因等。

此外, 本发明还涉及一种用于向山莴苣叶绿体中定点转化外源 DNA 的序列, 它具有 SEQ ID NO:3 所示的序列或其不小于 1kb 的片段, 以及 SEQ ID NO:4 所示的序列或其不小于 1kb 的片段, 在叶绿体定点转化载体上应含有上述两个定位片段的序列, 从而实现山莴苣叶绿体定点转化。定位片段是用基因克隆技术从与山莴苣同科的莴苣叶绿体基因组中克隆出来的两段相邻的 DNA 片段 (SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4), 将其构建在载体中使外源基因序列, 即口蹄疫多肽疫苗基因序列位于两个片段的中间, 当载体导入叶绿体时, 这两 DNA 片段能以同源重组形式将

片段间的序列整合到叶绿体基因组的序列上。在本发明中提供的适合整合位点是山莴苣叶绿体基因组中的 *trnH* 基因和 *psbA* 基因之间的间隔区, 即 SEQ ID NO: 3 的 3' 端到 SEQ ID NO: 4 (图 4) 的 5' 端区域。第一片段有 1715 个核苷酸, 包含 *rp12* 基因、*trnH* 及 *psbA* 的 5' 非翻译区和终止序列; 第二个片段共有 2355 个核苷酸, 包含部分 *psbA* 基因、*trnK* 和 *MatK* 基因的部分序列。以此为定位片段构建的山莴苣叶绿体定点转化载体, 可将口蹄疫疫苗基因定点插入到山莴苣叶绿体基因组的 *trnH* 基因和 *psbA* 基因之间的间隔区, 即山莴苣叶绿体基因组中第一片段的 3' 端至第二片段的 5' 端之间。这两个片段的获得可利用已知烟草叶绿体 DNA 序列设计引物, 用 PCR 的方法从山莴苣叶绿体基因组中分离相应的 DNA 片段。也可以从根据本发明提供的上述序列设计引物进行扩增。

*trnH7* 基因和 *psbA* 基因之间的间隔区可以保证这一转化过程不引起原有叶绿体基因组重要序列的丢失, 或干扰临近基因的正常功能, 整合位点是在叶绿体基因组的非功能区或功能不重要区内。所谓基因组的非功能区是指植物基因组中不具编码蛋白质、调控基因复制、转录、翻译等一切生化反应功能的核苷酸序列, 如基因之间的间隔区、假基因序列区、转录间隔区等。而功能不重要区是指植物基因组中的核苷酸序列, 它所表达的产物在植物的正常生长发育和生理代谢中不起重要的作用, 缺失后不影响植物的正常发育与代谢活动。

本发明所述的山莴苣叶绿体转化载体是在普通克隆载体基础上构建的, 其中所述的普通克隆载体可以是现有技术中已知的任何一种克隆载体, 例如 pBluescript 系列或 pUC18 系列等。

由于用于本发明的山莴苣叶绿体定点转化载体上口蹄疫疫苗基因将在叶绿体中表达, 所以基因的上游连接有叶绿体启动功能的叶绿体启动子, 构成口蹄疫疫苗基因的叶绿体表达框才能在叶绿体中表达, 在本发明所使用的启动子为来自莴苣叶绿体 *psbA* 基因的启动子 *PpsbA*, 终止子为莴苣 *psbA* 基因的终止子 *TpsbA*。虽然如此, 其它具有相同作用的叶绿体启动子和终止子也适用于本发明中, 如来自烟草的相应叶绿体基因启动子和终止子。上述疫苗基因的叶绿体表达框与一个同样由叶绿体启动子启动表达的筛选标记基因叶绿体表达框一起作为本发明中山莴苣叶绿

体的定点转化载体上的外源基因。它们的插入位点为 *trnH* 基因和 *psbA* 基因之间的间隔区。该载体应用的主要目的是建立口蹄疫疫苗的山莴苣高效的叶绿体表达体系,包括转化方法、获得同质化转化体的步骤,特别是融合基因中 GFP 基因产物在长波紫外下会激发绿色荧光,为检测和分析疫苗基因的表达十分有利。

在载体构建方面,要具备的筛选标记基因以便于转化个体的筛选。本发明所使用的是抗生素标记基因,即壮观霉素基因。但也可应用其它可用于植物叶绿体转化选择的标记基因,特别是甜菜碱醛脱氢酶基因,即 BADH,这时在培养基上加入甜菜碱醛以筛选转化体。

在载体的导入方面,常用的基因枪法、微束激光穿刺法、原生质体融合合法均适合于本发明所述的山莴苣叶绿体转化。

在叶绿体转化个体的筛选方面,本发明使用了壮观霉素筛选标记基因,只要在培养基中加入适当浓度的壮观霉素便可得到转化个体。本发明所谓适当的抗生素浓度为 15-100mg/L,若采用 BADH 基因作为转化载体上的筛选标记时,培养基中的甜菜碱醛浓度在 5-10mg/L。

本发明提供方法可以将口蹄疫疫苗基因导入山莴苣叶绿体基因组中,并将转化植株用于口蹄疫疫苗的生产,与目前使用的口蹄疫疫苗生产方法相比,它具有如下的优点:整个生产过程通过种植转化山莴苣即可,不涉及到病毒的培养和繁殖,具有极高的安全性;表达效率高,可比植物的核基因转化的表达效率提高至少 10 倍,甚至高出 100 倍;使生产成本大大降低。另外山莴苣本身是一种极好的饲料,因此,本发明提供的表达口蹄疫疫苗的山莴苣植株为全新的口服疫苗提供基础,对其预防有重要意义。

## 附图说明

图 1. 口蹄疫疫苗基因的莴苣叶绿体定点转化和表达载体构建图。图中 SalI 和 NcoI 酶切点间为多肽疫苗融合基因片段,其中 GFP 为绿色荧光蛋白基因序列,F 为合成的多肽疫苗基因片段。

图 2. 合成的寡核苷酸片段的拼接示意图



## 实施例 1. 口蹄疫多肽疫苗基因制备

### 1. 序列设计

口蹄疫多肽疫苗基因序列主要是采用国内病毒株系的序列，并根据将来基因表达的受体对密码子偏爱的情况进行了重新设计。

- 5 所采用的口蹄疫多肽疫苗基因序列从国际基因数据库（GeneBank）中获得，主要选取来自中国的 O 型病毒的 O58 和 O86 株系，利用目前公认具有疫苗作用的编码 VP1 蛋白第 140-160 氨基酸的 20 个氨基酸多肽（以下称 20 肽）和第 200-213 氨基酸的 14 个氨基酸多肽（以下称 14 肽）序列，作为多肽疫苗基因中起免疫源作用的多肽序列。

- 10 由于合成的多肽疫苗基因将主要用于原核及原核性的叶绿体中表达，所以在设计时尽可能采用原核性偏爱密码子代替原有的密码子。替换主要是参考大肠杆菌对密码子偏爱情况确定的

- 为尽可能使用原核性密码子，在确定最终多肽疫苗基因序列时主要根据用作疫苗成分的病毒 VP1 蛋白上的氨基酸序列，直接采用大肠杆菌偏爱密码子。比如亮氨酸，就直接用大肠杆菌中利用率最高的 CTG 作为相应的核苷酸序列。

- 虽然设计好的多肽片段的核苷酸序列不是很长，但仍很难直接合成全长序列，故将其分段合成，上、下链分成几段合成，上链为 4 段，编码的分别为病毒 O58 株系 VP1 蛋上有免疫源性的的 20 肽、14 肽和 O86 株系的 20 肽和 14 肽（说明见前文），其核苷酸长度为 60bp 和 42bp 两种，上链 5'端全部磷酸化；下链为了合成的方便，设计了多个链，其中不仅有与上链完全对应片段，而且还有与同株系或不同株系不同上链有互补关系的片段。另外还根据多肽疫苗基因的序列设计了引物，用以扩增合成好的片段，而且在引物上加上了限制性内切酶的识别序列。设计好的多肽基因及引物交由 DNA 合成公司合成。

- 25 其具体序列如下表 1 所示：

表 1. 设计的寡核苷酸序列

编号	序列
A	5' gTg ACC AAA gTg AgA ggC gAT CTg Cag gTg CTg gCg CAg AAA gCg gCA CgC TCT CTg CCg (SEQ ID NO:15)
B	5' AgA CAT AAA Cag AAg ATT gTg gCA CCA ggC AAA CgC CTg CTg (SEQ ID NO:16)
C	5' gTg AgC AAC gTg AgA ggC gAT CTg CgA gTg CTg gCg CAg AAA gCg gAA AgA gCg CTg CCg (SEQ ID NO:17)
D	5' AgA CAT AAA Cag AAg ATT gTg gCA CCA gCA AAA CAA CTg CTg (SEQ ID NO:18)
1	5' gAA TTC TAA TA g CTC gAg gTC gAC Aag CTT ACC ATg (SEQ ID NO:19)
2	5' TTT ggT CAC CAT ggT AAg CTT gTC Gac (SEQ ID NO:20)
3	5' CgC TTT CTg CgC CAg CAC CTg CAg ATC gCC TCT CAC (SEQ ID NO:21)
4	5' Tgg TgC CAC AAT CTT CTg TTT ATg TCT Cgg Cag AgA gCg TgC (SEQ ID NO:22)
5	5' gTT gCT CAC CAg CAg gCg TTT gCC (SEQ ID NO:23)
6	5' CTC gAg CTA TTA gAA TTC CAg CAg gCg TTT gCC (SEQ ID NO:24)
7	5' gTT gCT CAC CAT ggT AAg CTT gTC gAC (SEQ ID NO:25)
8	5' Tgg TgC CAC AAT CTT CTg TTT ATg TCT Cgg Cag CgC TCT TTC (SEQ ID NO:26)
9	5' TTT ggT CAC CAg CAg TTg TTT TgC (SEQ ID NO:27)
10	5' CTC gAg CTA TTA gAA TTC CAg CAg TTg TTT TgC (SEQ ID NO:28)

## 2. 片段拼接

合成的寡核苷酸片段用双蒸水溶解，其中用于合成基因的均稀释到约 800 ng/ $\mu$ l，用作引物的合成片段溶解并稀释到 80 ng/ $\mu$ l。然后按图 2 所示方式进行拼接。

- 5 在图 2 中，片段 A 和 B 分别代表 O58 株系的 20 肽和 14 肽的上链，C 和 D 分别代表 O86 的 20 肽和 14 肽的上链寡核苷酸片段，1 代表的是一个人工设计的上链寡核苷酸片段，主要是提供酶切序列和作引物用，同样它的 5'端磷酸化，2、3、4、5、6、7、8、9、10 代表的分别是合成的下链寡核苷酸片段，其中有些链能同时与不同的上链相互补，以便用于拼接不同株系的上链，片段 1、6、10 还将用作引物来扩增合成链。

按 O58 (20 肽—14 肽) —O86 (20 肽—14 肽) 多肽顺序的基因拼接操作：

- 15 分别将片段 A、2、3 为一组；片段 B、4、5 为一组；片段 C、D、3、8、10、1 为一组，按等摩尔混合。混合好的片段溶液 10 $\mu$ l 放于已升温到 95℃的水浴锅中，断电后自然冷却 10 小时。

分别将片段 C、7、3 为一组，片段 D、8、9 为一组，片段 A、B、3、4、6、1 为一组按等摩尔混合。混合好的片段溶液 10  $\mu$ l 于已升温到 95℃的水浴锅中，断电后自然冷却 10 小时。

- 20 按 O86 (20 肽—14 肽) —O58 (20 肽—14 肽) 多肽顺序的基因合成操作同理。

## 3. 片段连接

- 25 按 O58 (20 肽—14 肽) —O86 (20 肽—14 肽) 多肽顺序的基因拼接操作的三组拼接产物各取适量混合，取 5  $\mu$ l 加入等量的连接缓冲液 I (大连宝生生物公司产品)，于 16℃连接 16 小时以上。70℃灭活 10 分钟后，用 TE 缓冲液稀释 100 倍，-20℃保存。

按 O86 (20 肽-14 肽) —O58 (20 肽-14 肽) 多肽顺序的基因拼接产物处理同上。

- 30 连接后的片段实际上是一环形 DNA 链，即按 O58 (20 肽—14 肽) —O86 (20 肽—14 肽) 多肽顺序的基因片段。

第一种情况的合成链，即按 O58 (20 肽-14 肽)—O86 (20 肽-14 肽) 多肽顺序的基因片段，由于片段上链寡核苷酸链 5'端磷酸化，所以连接成一完整的环形 DNA 单链。下链在寡核苷酸片段间仍是缺口，但不影响利用片段 1、10 作为引物，通过 PCR 可对其进行的扩增。第二种情况的合成方式相似。

#### 4. 合成片段的 PCR 扩增

利用引物序列对上述连接产物进行 PCR 扩增，PCR 在 PE480 PCR 仪上进行。

PCR 反应体系：10XPCR 缓冲液 5  $\mu$ l，10 mM dNTP 4  $\mu$ l，Pfu DNA 聚合酶 2U，引物 1 (80 ng/ $\mu$ l) 2  $\mu$ l，引物 2 (80 ng/ $\mu$ l) 2  $\mu$ l，连接产物 1  $\mu$ l，加水到总体积 50  $\mu$ l，上述成份均加入到 0.5 mL PCR 管，混匀后覆盖一层无菌石蜡油 (20-30  $\mu$ l)。

其中扩增按 O58 (20 肽-14 肽)—O86 (20 肽-14 肽) 多肽顺序的基因片段用片段 1、10 作为引物，扩增按 O58 (20 肽-14 肽)—O86 (20 肽-14 肽) 多肽顺序的基因片段用片段 1、6 作为引物。

PCR 程序为：95℃预变性 5 分钟；然后 94℃变性 1 分钟，65℃复性 1 分钟，72℃延伸 2 分钟，循环 30 次。反应结束后取 10  $\mu$ l PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。其余产物利用酚/氯仿抽提法纯化。纯化片段保存。

### 实施例 2. 口蹄疫多肽疫苗融合基因的莴苣叶绿体定点表达和转化载体构建

#### 1. 莴苣叶绿体 DNA 提取

叶用莴苣 (*Lactuca sativa*)，其品种为波士顿及奶油生菜，采用高离子强度、低 pH 方法提取油菜叶绿体 DNA。

取 5g 莴苣的幼嫩叶片，加入 40ml 4℃预冷的 Buffer A (25mM EDTA, 1.25 M NaCl, 0.25 M 抗坏血酸, pH3.6)，高速匀浆数次，至成糊状。浆液用 4 层医用纱布滤入 4 个 50ml 离心管中。4℃ 800g 离心 8min，弃上清，加入 (以下均为每管加入的量) 30ml 预冷的 Buffer B (50mM

Tris.HCl, 25mM EDTA, 1.25M NaCl, 10mM  $\beta$ -巯基乙醇, pH8.0) 重悬叶绿体。4℃ 800g 离心 8min, 回收叶绿体颗粒, 弃上清, 加入 30ml 预冷的 Buffer C (150mM NaCl, 100mM EDTA, pH8.0) 重悬沉淀。4℃ 1000g 离心 8min, 回收叶绿体, 弃上清, 加入 2ml Buffer D (50mM

5 Tris.Cl, 25mM EDTA, pH8.0) 重悬沉淀, 加入 0.5 ml 10% Sarcosyl (Buffer 配制) 和 20 $\mu$ l Proteinase K (10mg/ml), 于 45℃ 轻摇 4-6h。用等体积 Tris 饱和酚抽提数次, 再用酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 抽提 1-2 次, 至界面干净。上清中加 1/10 体积 3mmol/L NaAc(pH5.2) 和 2 倍体积无水乙醇, -20℃ 过夜。4℃ 12000g 离心

10 15min, 回收 DNA, 溶于 500 $\mu$ l TE(pH8.0) 中, 加入 5 $\mu$ l 10mg/ml 的 RNase A, 37℃ 保温 1h。用酚: 酚/氯仿抽提至界面干净, 上清中加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc(pH5.2) 和 2 倍体积的无水乙醇, -20℃ 放置 2h 以上。4℃ 15000g 离心 20min, 回收 DNA。70% 乙醇洗涤 DNA, 真空抽干, 溶于 50 $\mu$ l TE(pH8.0) 放置于 -20℃ 保存待用。

15

## 2. 莼荳叶绿体 DNA 片段分离及克隆

用下列引物进行扩增如下:

P1: ATGCCCTACCTTTGAGTGC (SEQ ID NO:5)

P2: GGAGTCGACTTTCCTCTTATTGTAATTGTATAGG (SEQ ID NO:6)

20 P3: AGAGTCGACAGAGGAAAGCCGTGTGC (SEQ ID NO:7)

P4: GTGGATCCTTGGGAAAAGAATATATAAACCTC (SEQ ID NO:8)

PCR 反应体系: 10XPCR 缓冲液 5  $\mu$ l, 10 mM dNTP 4  $\mu$ l, Pfu DNA 聚合酶 2U, 引物 1 (30 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ l, 引物 2 (30 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ l, 莼荳叶绿体 DNA 10-100 ng, 加水到总体积 50  $\mu$ l, 上述成份均加入到

25 0.5 mL PCR 管, 混均后覆盖一层无菌石蜡油 (20-30  $\mu$ l)。

PCR 程序为: 95℃ 预变性 5 分钟; 然后 94℃ 变性 1 分钟, 50℃ 复性 1 分钟, 72℃ 延伸 2 分钟, 循环 30 次; 延伸 10 分钟。

- 用引物 P1 和 P2 扩增的片段经 *Hind* III 和 *Sa*II 酶切, 电泳回收的 1kb 大小的产物带, 并连接于同样酶切的克隆质粒 PUC-18 中, 而利用引物 P3 和 P4 扩增的片段经 *Bam*HI 和 *Pst*I 酶切后, 电泳回收 1kb 大小的带, 连接于同样酶切的克隆质粒 pBluescript SK (Promega 公司) 质粒中, 这两个重组质粒经酶切验证后, 再进行测序 (上海博亚公司), 确认正确后保留, 这两个片段的克隆分别定名为 pLCT-HF1 和 pLCT-HF2。

### 3. 莴苣叶绿体基因 *psbA* 启动子分离和克隆

利用如下引物进行扩增:

- 10 P5: AGAGTCGACAGAGGAAAGCCGTGTGC (SEQ ID NO:9)  
P6: ATTCCATGGTAAAATCTTGTTTATTAA (SEQ ID NO:10)

- PCR 扩增方法同前文, 其中延伸时间缩短为 1 分钟, 利用这对引物扩增的片段经 *Sau*3A 和 *Nco*I 酶切后, 电泳回收 130bp 的片段, 这就是 *psbA* 基因的启动子片段。多肽疫苗基因片段用 *Eco*RI 和 *Nco*I 酶切, 与电泳回收的启动子片段一同与 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切的 pBluescript SK 连接, 这样就克隆了莴苣叶绿体基因 *psbA* 的启动子, 并且其下游就是多肽疫苗基因片段。该克隆质粒定名为 pLCT-PpsbA1/F。

### 4. 用于叶绿体表达的口蹄疫多肽融合基因表达框构建

- 20 利用下述引物, 以 pART27 (*GFP*) 质粒为模板进行 PCR 扩增即可获得 *GFP* 基因片段。

P7: 5' GCTGAATTCATGAGTAAAGGAGAAGAACTT (SEQ ID NO:11)

P8: 5' GCGGTCGACTTATTATTGTATAGTTCAT (SEQ ID NO:12)

扩增体系同莴苣片段。

- 25 PCR 程序为: 95℃预变性 5 分钟; 然后 94℃变性 1 分钟, 55℃复性 1 分钟, 72℃延伸 2 分钟, 循环 20 次; 延伸 10 分钟。

扩增得到的 *GFP* 片段经 *EcoRI* 和 *BamHI* 酶切后插入到同样酶切的 pLCT-PpsbA1/F 质粒中, 这样获得的质粒上 *GFP* 基因在多肽疫苗基因的下 游, 构建成一个由莴苣叶绿体 *psbA* 基因启动子启动表达的多肽疫苗基因 -*GFP* 融合基因表达框。质粒定名为 pLCT-PsbA1/F-GFP。

5

## 5. 莴苣叶绿体定点转化和表达载体的构建

将同源重组片段 2 从质粒 pLCT-HF2 上用 *EcoRI* 和 *BamHI* 切下, 电泳回收约 1kb 大小的片段, 用 T4 DNA 连接酶连接同样酶切的 pLCT-HF1 上, 获得质粒 pLCTH-A。

- 10 用 *BamHI* 和 *SaII* 将多肽疫苗融合基因的叶绿体表达盒从质粒 pLCT-PsbA1/F-GFP 上切下, 插入到经同样酶切的 pLCTH-A 上, 得到带有多肽疫苗融合基因的叶绿体表达盒的叶绿体转化载体质粒 pLCTH-A(F-GFP)。

用 *BamHI* 酶切质粒 pSZB8, 得到一个 1.3kb 片段, 这是筛选标记基因 *aadA* 的表达盒(Prrn-*aadA*-TpsbA), 电泳回收此片段, 插入到经同样酶切

- 15 的 pLCTH-A(F-GFP) 上, 得到最终的转化载体(见图 1)。

## 实施例 3. 叶绿体转化

### 1. 外植体

- 20 无菌苗: 将山莴苣种子用 0.1% 升汞消毒 15 分钟后, 播种在 MS 培养基上待其发芽生长后, 取其嫩叶平铺于 MS 培养基上培养 2-3 天备用。

消毒叶片: 水培山莴苣嫩叶用 4% 次氯酸钠消毒 15 分钟后, 平铺于 MS 培养基上培养 5 天备用。

愈伤组织: 无菌苗叶片放于 MB2 培养基上连续诱导培养 30 天以上形成的绿色愈伤组织。

25

### 2. 质粒大量制备

将用于山莴苣叶绿体定点转化的和表达载体 pLCM-A/pLCM-C, 用 100ml LB 液体培养基扩增培养过夜后, 收集菌体并用碱裂解法提取质粒 DNA, 提取质粒 DNA 经琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度计检测纯度及浓

度。

### 3.植物培养基

MS: MS 基本成分、蔗糖 3%、肌醇 0.1 g/L、琼脂 0.5%, pH 5.8。

5 MB2: MS 基本成分+6-BA0.2 mg/L+IAA1.0 mg/L、蔗糖 3%、肌醇 0.1 g/L、琼脂 0.5%, pH 5.8。

MB5: MS 基本成分+6-BA 0.5 mg/L+IAA 1.0、蔗糖 3%、肌醇 0.1g/L、琼脂 0.5%, pH5.8。

MN: 蔗糖 3%、无机盐用 1/2MS、肌醇 0.1 g/L、琼脂 0.5%, pH5.8。

10

### 4.基因枪子弹制备

#### (1) 钨粉悬液的制备

60 mg 钨粉 ( $\Phi 0.8\mu\text{m}$ ) 放在离心管中加无水乙醇, 用超声波粉碎机 30 秒一次间隔 1 分钟至温度发烫, 静置 5 分钟, 离心 10000rpm 5 分钟去上清;

15

加 1 ml 无水乙醇涡旋 5 分钟, 静置 1 分钟, 离心 10000rpm 5 分钟去上清;

加入 1 ml 无菌水涡旋 3 分钟, 离心 10000 rpm 5 分钟去上清 (重复 3 次);

20

在沉淀的钨粉中加入 50%甘油 1 ml, 震荡成为悬浮液, 分装 50  $\mu\text{l}$ /管, 放于 4℃ 保存。

#### (2) 微弹的制备

取 1 管 50  $\mu\text{l}$  钨粉加入 5  $\mu\text{l}$  质粒 LBG-A 震荡 30 秒; 加 20  $\mu\text{l}$  亚精胺 (0.1M) 震荡 30 秒; 加 50  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  (2.5M) 涡旋 60 秒, 静置 1 分钟  
25 离心 3000 rpm 30 秒去上清; 加入 150  $\mu\text{l}$  70%乙醇洗沉淀, 离心 3000 rpm 10 秒去上清; 加入无水乙醇 150  $\mu\text{l}$  不破坏沉淀静置 1 分钟去上清; 加入 60  $\mu\text{l}$  无水乙醇重悬。轰击时每枪取 10  $\mu\text{l}$ 。

### 5.基因枪转化



利用国产的基因枪进行转化。具体参数为采用 70Pa 的可裂膜，轰击距离 7-9cm。

轰击后外植体放于普通 MS 培养基上 2 天，然后移至含有观状霉素培养基上培养，首先用的是 MB2 培养基，经过约 2-4 周时间的诱导和筛选培养，当外植体有愈伤组织出现时转入 MB5 培养基上，继续培养至诱导芽。

长出芽的叶伸至 1-2cm 时，可切下再次放于 MB2 培养基上，重新进行诱导和筛选培养以便进行同质化的筛选。也可以放于 MN 培养基上生根，得到完整的转化植株。

10

#### 实施例 4. 转基因山莴苣的检测

##### 1.GFP 荧光鉴定

用长波紫外灯照射所(国产的三波长紫外检测仪上的长波即可)得到的绿苗，能发出绿色荧光的为转基因个体。或利用荧光显微镜的兰光激发条件下观察转植株的叶片，有绿色荧光的为转化植株，由于口蹄疫多肽序列是在绿色荧光蛋白的上游，所以可以通过绿色荧光蛋白基因表达情况证实口蹄疫免疫源性多肽的表达。

##### 2. 叶绿体转化的同质化 PCR 方法检测

采用根据转化载体同源片段以外叶绿体 DNA 的序列设计引物进行扩增，若叶绿体基因组中插入位点插入外源基因，由扩增出增大的片段。这里应用的引物序列为：

5'TAAAGCCTTCAATGGTACGCAGTC (SEQ ID NO:13)

5'CGACGAAACCTAGAAATCGATCACTG (SEQ ID NO:14)

扩增体系采用适合于长片段扩增的 PCR 体系。在本实施例中采用的是 LA-PCR 或 Premix<sup>EX</sup>(Takara), 或 Taq plus(sangon). 由于头几轮再生得到的转化植株中叶绿体有大量的未转化的 DNA 分子，所以用上述引物扩增会检测到明亮的 3.7kb 大小的片段，即在转化体叶绿体的 psbA 和 trnH 之间没有外源 DNA 片段的插入。另外还将扩增得到一个较弱的约 6.1kb 大小

30

小的片段，这是由于转化的叶绿体基因组中 psbA 和 trnH 基因间有一个

约 2.4kb 的外源 DNA 片段的插入, 这种情况表明虽然外源基因已插入到叶绿体基因组中, 但仍有大量叶绿体的 DNA 没有被转化, 即仍未达到同质化。经多轮同质化筛选后, 若扩增产物中只能检测到约 6.1kb 大小的片段, 即表明所有叶绿体的 DNA 都插入了外源基因片段。

5

### 3. 口蹄疫疫苗基因表达产物的检测

阳性抗原制备: 将原核表达载体质粒 pET28a 利用 *NcoI* 和 *Sall* 酶切, 回收切开的质粒片段, 将其与 *NcoI* 和 *EcoRI* 酶切的多肽疫苗基因片段、*EcoRI* 和 *Sall* 酶切的 *GFP* 基因片段一同进行连接, 连接产物转化受体菌 BL21 的感受态, 获得的含多肽疫苗融合基因的载体质粒的转化子, 参照相关 pET 产品说明书将转化子菌体进行诱导培养, 收集菌体, 分离产物经 SDS 蛋白电泳检测纯度后为阳性抗原。另外蛋白还可从 SDS-PAGE 胶上切下, 干燥粉碎后注射动物 (如兔) 获得相应的抗血清。

植物蛋白的提取: 取 100mg 植物材料, 加研磨缓冲液 (10mM Tris.Cl, 0.02 NaN<sub>3</sub>, 0.001% PMSF, pH 8.0) 200 $\mu$ l, 冰浴中研成匀浆, 5000rpm 室温下离心 10 分钟, 取上清。

酶联免疫测定: 按标准的酶联免疫方法进行测定, 其中检测样品为从原核表达分离的阳性蛋白样口, 从转化的植物分离的蛋白, 并未转化植物分离出的蛋白作为阴性蛋白样品。

取一定量样品加入到反应板中包被, 其阳性抗原蛋白按梯度加于反应板的孔中。

洗掉多余的抗原。

加入测试抗体—兔抗口蹄疫抗血清 (利用阳性蛋白注兔子产生的, 或直接用中国兰州兽医所生物所的兔抗口蹄疫血清)。

洗掉多余的抗体。

加入碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG。

洗去未结合之二抗。

加入 NBT/BCIP 显色液。

显色

酶标仪测定吸光值(OD 值), 根据从植物中分离抗源的有色终产物含量和阳性抗原有色产物梯度即可测量带测抗原的含量。

一般地讲, 同质化的转化植物中多肽疫苗融合蛋白可占总可溶蛋白的1%以上。

## 序列表

<110> 甘肃亚盛集团  
中国科学院遗传研究所

<120> 用于生产口蹄疫疫苗的山萘芭叶绿体转化植物的获得方法

<130> 12001665

<160> 28

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 204

<212> DNA

<213> 口蹄疫疫苗

```

<400> 1
gtgaccaaag tgagaggcga tctgcaggig ctggcgCaga aagcggCacg ctctctgCCg      60
agacataaac agaagattgt ggCaccaggc aaacgcctgc tggtgagcaa cgtgagaggc      120
gatctgcgag tgctggcgca gaaagcggaa agagcgctgc cgagacataa acagaagatt      180
gtggcaccag caaaacaact gctg                                             204
  
```

<210> 2

<211> 204

<212> DNA

<213> 口蹄疫疫苗

```

<400> 2
gtgagcaacg tgagaggcga tctgcgagtg ctggcgCaga aagcggaaag agcgctgCCg      60
agacataaac agaagattgt ggCaccagca aaacaactgc tggtgaccaa agtgagaggc      120
gatctgcagg tgctggcgca gaaagcggca cgctctcigc cgagacataa acagaagatt      180
gtggcaccag gcaaacgcct gctg                                             204
  
```

<210> 3

<211> 1715

<212> DNA

<213> 萘芭

<400> 3

ggagtcgact ttggctttat tglattgta taggagtttt tgaactaaaa aaggagcaat	60
aatgccctct tgaataaaca agaggggaagc tatttctctt tttttttat ttagtagtat	120
tigccttaca tagtttcttt agaaataaca aggtcttttg ttgggttcga ttagcatgtt	180
tctctttgt attaatftag aggtttatat attctttcc caatgtttta tgaagtttga	240
tttacaattg aatttcaatc taaaatagat aaaaatgaaa atttttatta tttatttctt	300
tgatitcaga aataagaaag aaaataagaa agaaataata tgctcttttt tttctgtta	360
atggaaaaat ctagaataac tagataatag tagaggggCG gatgtagcca agtggatcaa	420
ggcagttgat tglgaatcca ccatgcgcgg gttcaattcc cgtctgtcgc ccaaatgaa	480
tttaatttat ttttttaatt aaattattcg ctacaaacgg atttttttt agtgaacgtg	540
tcacagcttc ctcttatit ttgttttgt aaagacgaag aaagaaattc tatttctct	600
cctatttact acggcgacga agaatacaat taccatata tttattcctt tttctacttc	660
ttttccaag tgcaggataa cccaaggagg ttgtgggttg tttctacca attggggccc	720
tcctttcacc acccccatgt ggaaggctta cagggttcat aactactcct cttaactacag	780
ggcgcttacc tagccaacgc ttagatccgg ctctacccaa actttctgg ttcaccccaa	840
catccccac ttgtccgact gtgtctgagc agtttttga tatcaaacgg acctccccag	900
aaggtaattt taatgtggc gatttccctt cttttgcaat cagtttcgt acagcaccgg	960
cgtctctagc taattgtcca ccttttcaa gtgtgatttc tatgttatgt atggccgtgc	1020
ctaaggcat atcgggtgaa gtagattctt cttttttatc aatcaaaacc ctttcccaaa	1080
cgtlacaagc tttttccaaa gcatacggct tcttggaagt agatgggtat atciatacag	1140
atggatctta tatatatgtt ataataaagt accacatggg tggatatata ggaatcaaaa	1200
tctgccgaat cactcatgtt atgacttctt acatcctagg tcttcccggt ccatcatctg	1260
gcttatgttc ttcatttagc attcagaccg gatgactcta ttaaattacg ttgatacttc	1320
cacatattat gggtaacgtt gagacatct ctatttttcc ccccggaat ctttagaatt	1380
accactgctt agctttcaat tgcctctga ccatcaaatg aaatgtgaat aatccgtcct	1440
cttctctttg aaagaagggg cgcttccggt tctgtcgggt ctggaacaa ttttgtcttc	1500

tccatattac tatactctta gagtcaataa ttttatatga ggaactactg aacicaatca 1560  
 ctitgctgccg ttacicttca gttttctgtt gaggcttact ctgtagaggt actcaaatig 1620  
 gatcagtgat cgatttctag gtttcgtcgt aaacctaat ggttacttcc aattacgtaa 1680  
 atcaatagtt caaacgcac tcaaggtag ggcat 1715

<210> 4  
 <211> 2355  
 <212> DNA  
 <213> 莴苣

<400> 4  
 gggtatctt tcaagtgtc ggctaaagcc ttcaatggta cgcagtcasa tgctagaaaa 60  
 tgcatttata attgaaaatg ctatlaagaa gtttgagact atgtttccaa ttatgccttt 120  
 gatggatca ttggctaaat ctaaaatttg taatgcattg gggcatccta ttggtaaggc 180  
 gatttggcc gatcttcag attctgatat tattgaccgc ttgggcgta tatacagaaa 240  
 tcttictcat tatcatagtg gatcttcaaa aaaaaagagt ttgtatcgag taaagtatat 300  
 acttcgactt tcttgtcta gaactttagc tcgtaagcat aaaagcactg tacgtgcttt 360  
 ttgaaaaga ttgggtcgg aattattaga agaaticttt acggaagaag aacaagtttt 420  
 ttccctgacc ttccaaggg ttctttccat ttcggaagg ttatctagaa ggcggatttg 480  
 glatttggat attatttga tcaatgattt ggccaatcat gaatgattg ttaigaaacc 540  
 ttgtaaatal aaatttcac actaaataat ctaataata atgtaaataa tgaagagcta 600  
 acaaaaaatt atttcttct attctgaat gtgtatgtag tatgtagtaa ggaigaaatc 660  
 aactgagtat tcaatctttt ctgtctaat gaaggaaactg agttttagat gtatcacagag 720  
 ggaaagccgt gtgcaatgaa aaatgcaagc acggcttggg gagggatttt tacttattta 780  
 actttaacaa ggaaattatc tactccaacc gactagtacc gggttcgaat cccgggcaac 840  
 ccatgtcat agtgaattta aattatagc atagtgtata gaaatcttt ttttttatt 900  
 ttgtcaaacc gcitttgatt tacaaaaat tgaactagat ccagatagat attgggtgac 960  
 acgggcatat aagtcatggt atactgttaa ataacaagcc tttagtttt catttgaaaa 1020

```

ttcgtgcgct tgggagtcgc tgataattaa ataaaccaag attttacat gactgcaatt 1080
ttagagagac gcgaagcgga aagcctatgg ggtcgcttct gtaactggat aaccagcacc 1140
gaaaaccgtc ttatcatigg atggtttggg gttttgatga tccctacctt attgaccgca 1200
acttctgtat ttattatcgc ctcatatgct gctcctccag tggatatiga tggtatctgt 1260
gaaccigtit ctggatctct actttatgga aacaataata tticagggtc cattatttct 1320
acttctgcag ctatagggtt gcatttttac ccaatatggg aagcagcatc cgttgatgaa 1380
tggttatata atgggtggtc ttatgaacta attgttctac acttcttact tgggttagct 1440
tgttcatagg gtctgtagtg ggagcttagt ttccgtctgg gtagcgacc ttggatgct 1500
gttgcatatt cagctcctgt tgcagctcgc actgctgttt tcttgatcta cccaatfggt 1560
caaggagctt ttctgatgg tatgcctcta ggaatttctg gtactttcaa ctcatgatt 1620
gtattccagg ctgagcaca catccttatg caccatttc acatgctagg cgtagctggt 1680
gtattcggcg gctccctatt tagtgctatg catggttctt tggtaacctc tagtttgatc 1740
agggaaacca cagaaaatga atctgcta at gaaggttaca gattcggtca agaagaaga 1800
acttataata tctagccgc tcatggttat ttggccgat tgaatctcca atatgctagt 1860
ttcaacaact ctgttcttt acatttcttc ctagctgctt ggccgttagt aggtatctgg 1920
ttcactgctt taggtatcag cactatggct ttcaacctaa atggtttcaa ttcaaccaa 1980
tcggtagttg atagtcaagg ccgtgtaatt aatacttggg ctgatatcat taaccgtgct 2040
aaccttggtt tggaagttat gcatgaacgt aatgctcata atttccctct agacttagct 2100
gctatcgaag ctccatctac aaatggataa gactttggc ttattgta at tgtataggag 2160
tttttgaact aaaaaaggag caataatgcc ctcttgataa aacaagaggg aagctatttc 2220
tctttttt ttatttagta gtatttgcct tacatagttt cttagaanaa acaagggtct 2280
tttgtttggt tcatgtagca tgttttctct ttgtattaat ttgagggtt atatatctt 2340
ttccaagga tccac 2355

```

&lt;210&gt; 5

<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引物

<400> 5  
atgccctacc ttgagtgC

19

<210> 6  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引物

<400> 6  
ggagtcgact ticcicttat tgtaattgta tagg

34

<210> 7  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引物

<400> 7  
agagtcgaca gagggaaagc cgtgtgc

27

<210> 8  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引物

<400> 8  
gtggatcctt gggaaaaagaa tatataaacc tc

32

<210> 9  
<211> 27



<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引物

<400> 9  
agagtcgaca gagggaaagc cgtgtgc

27

<210> 10  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引物

<400> 10  
atccatgggt aaaatcttgg tttatttaa

29

<210> 11  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引物

<400> 11  
gctgaattca tgagtaaagg agaagaactt

30

<210> 12  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引物

<400> 12  
gcggtcgact tattatttgt atagttcat

29

<210> 13  
<211> 24  
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 13

taaagccttc aatggtacgc agtc

24

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 14

cgacgaaacc tagaaatcga tcactg

26

<210> 15

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 15

gtgaccaaag tgagaggcga tctgcaggig ctggcgcaga aagcggcacg ctctcigccg

60

<210> 16

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 16

agacataaac agaagatgt ggaccaccggc aaacgcctgc tg

42

<210> 17

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 寡核苷酸

&lt;400&gt; 17

gtgagcaacg tgagaggcga tctgcgagtg ctggcgacga aagcggaaag agcgcctgccg 60

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 42

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 寡核苷酸

&lt;400&gt; 18

agacataaac agaagattgt ggcaccagca aaacaactgc tg 42

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 寡核苷酸

&lt;400&gt; 19

gaattctaata agctcgaggt cgacaagcct accatg 36

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 寡核苷酸

&lt;400&gt; 20

tttggtcacc atggtaagct tgctcgac 27

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 寡核苷酸

&lt;400&gt; 21

cgcttttctgc gccagcacct gcagatcgcc tctcac

36

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 42

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 寡核苷酸

&lt;400&gt; 22

tgglgccaca atcttctgtt tatgtctcgg cagagagcgt gc

42

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 寡核苷酸

&lt;400&gt; 23

gttgctcacc agcaggcggtt tgcc

24

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 寡核苷酸

&lt;400&gt; 24

ctcgagctat tagaatcca gcaggcggtt gcc

33

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 寡核苷酸

<400> 25

gttgctcacc atgctaagct tgtcgac

27

<210> 26

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 26

tggtgccaca atcttcigt ttatgtctcg cagcgctctt tc

42

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 27

tttggtcacc agcagttgtt ttgc

24

<210> 28

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 28

ctcgagctat tagaatcca gcagttgttt tgc

33

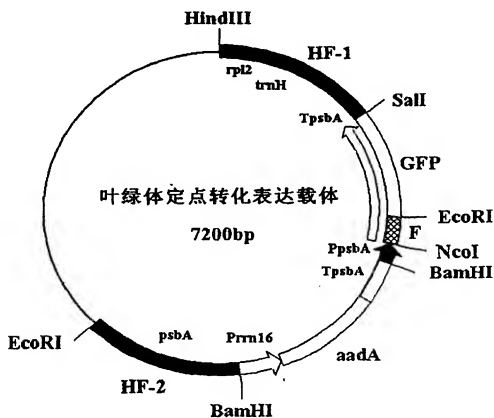


图 1

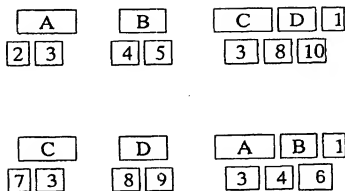


图 2